

B-6 嫌氣的廃水処理過程における好気性微生物の消長

ユニチカ（株） 中央研究所 環境技術研究部 ○山田 健二
 東京大学大学院 工学系研究科 都市工学専攻 佐藤 弘泰
 同上 味埜 俊
 同上 松尾 友矩

1. はじめに

生物学的廃水処理プロセスでは、さまざまな微生物が相互作用を行いながら処理反応を行っている。それぞれの反応槽内の微生物の優占種やその挙動を把握することは、処理効率の向上やプロセスの安定化のために重要である。その中で、汚泥濃縮槽は、好氣的に生成された汚泥が嫌氣的な分解を受ける最初の段階であり、そこでは好気性微生物と嫌気性微生物の混合により、微生物群集変化が起こっていると考えられる。

これらの微生物群集変化の研究手法として、蛍光In-situ hybridization (FISH) 法は、微生物の培養なしに、槽内の特定微生物あるいは微生物群を検出できる手法として注目されている。また、キノンプロファイル法は、微生物の培養なしに、微生物をグループ分けして、それぞれの存在比を測定できる手法として注目されている。

そこで、本研究は、嫌氣的な濃縮汚泥を用いた反応槽に好気性微生物 (*Acinetobacter calcoaceticus*) を混合し、経時的な微生物変化の観測を目的に行った。そのため、培養に依らずに群集組成に関する情報を得られる、これらの手法を用いて微生物の消長について測定を行い、考察を行った。

2. 実験方法

2.1 供試サンプルと実験方法

実験には水理学的滞留時間 (HRT) の異なる3種類の嫌氣的濃縮汚泥を用いた。これらは、実処理場の高温嫌気性消化汚泥を種汚泥として実験室内活性汚泥リアクターの濃縮余剰汚泥を用いて嫌気状態、20℃、HRTを2、5及び10日に設定して馴致した。

好気性微生物には、キノンプロファイル法やFISH法による追跡が容易な *Acinetobacter calcoaceticus* (IAM12580) を純粋培養して用いた。この細菌は活性汚泥中に存在することが知られている。また、*Acinetobacter* 属特異的のプロープを用いて、FISH法で検出できる。さらに、優占キノン種は一般に活性汚泥中の微生物には少ない、ユビキノン-9 (Q-9) である。

実験は、内容量約70mlのバイアル瓶に、嫌気性汚泥30mlとMLVSS換算で約10%となるように、純粋細菌を5ml加えた。バイアル瓶を密栓後、窒素置換により酸素を追い出し、嫌氣的な条件で反応を行った。反応は20℃で100rpmの巡回攪拌で行った (図1参照)。適時1個ずつバイアル瓶を開封し以下の測定を行った。

2.2 測定方法

FISH法¹⁾、キノンプロファイル²⁾、COD測定、発生ガス量及び組成分析、その他水質測定は定法にしたがって行った。

FISH法では、*Acinetobacter* 属を検出するACA652 (5'-ATCCTCTCCCATACTCTA)、古細菌を検出するArch915 (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT)、及び真正細菌を検出するEub338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT) をプロープとして用いた。標識にはCY5 ($\lambda_{ex}=648\text{nm}$, $\lambda_{em}=670\text{nm}$)、XRITC ($\lambda_{ex}=580\text{nm}$, $\lambda_{em}=605\text{nm}$) を用いた。また存在割合の測定のために全菌染色用のDTAF³⁾ (5-(4,6-Dichlorotriazinyl)-aminofluorescein, $\lambda_{ex}=492\text{nm}$, $\lambda_{em}=513\text{nm}$) を用いた。各微生物群集の存在割合は画像解析ソフトを用いて、それぞれの蛍光を発している部分の面積の割合から

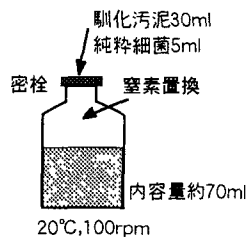


図1 実験条件

求めた。

キノプロファイル法は、汚泥サンプルより抽出したキノンを精製し、HPLCによって分析した。ユビキノンはQ-10換算量、メナキノンはビタミンK1換算量で表した。

3. 結果と考察

本予稿集では、HRT=10日で馴致した濃縮汚泥を用いた実験から得られた結果を図2、3、及び4に示した。

3.1 FISH法による観測結果

ACAプローブによって、*A. calcoaceticus* を特異的に検出した。前報⁴⁾の高温嫌気性消化汚泥では、*A. calcoaceticus* は2日程度で検出できなくなったが、今回の実験では、図2に示すように、その存在割合にほとんど減少が見られなかった。すなわち、馴致した濃縮汚泥中では、*A. calcoaceticus* は溶菌、あるいは、活性の低下を引き起こしていないと考えられる。

Eubプローブによって検出される真正細菌の割合は、60-70%程度でほぼ一定であった。また、Archプローブによって検出される古細菌の割合は、ほとんど0%に近い値を示した。HRT=10日の場合のみ、前者の割合が40%程度まで減少し、後者の割合が微増した。このことから、馴致した濃縮汚泥には、真正細菌が多く存在し、古細菌のメタン生成細菌はほとんど存在していないと考えられる。すなわち、HRT=10日以下の条件では、馴致前には存在したメタン生成菌の大部分がウォッシュアウトしてしまったと考えられる。

また、EubプローブとArchプローブによって検出される割合の和は、DTAFに対して約70%程度であり、残りの約30%はrRNA含量が少なくプローブでは検出できない微生物、すなわち、細胞は保持されているが活性が低下してしまっている微生物等と考えられる。

測定上の問題点として、実験後半の点は、微生物の活性低下による蛍光強度の低下が見られ、閾値の取り方によって、値にばらつきが生じた。FISH法における定量性および定量法は今後の検討課題である。

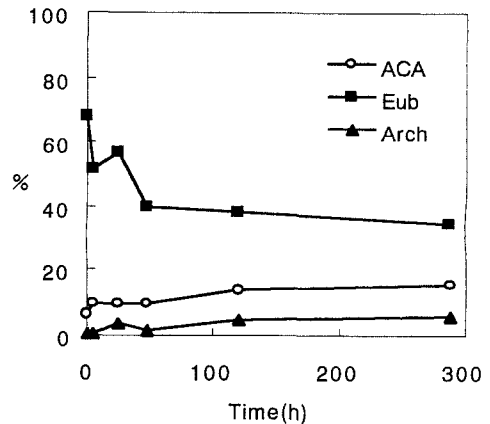


図2 FISH法による経時変化

3.2 キノン組成分析結果

図3において、*A. calcoaceticus* に特徴的なユビキノ-9 (Q-9) に注目すると、その絶対量は、最初投入した*A. calcoaceticus* 由来のQ-9の量のまま、ほとんど変化しなかった。すなわち、*A. calcoaceticus* の生物量は変化していないと考えられた。また、ユビキノンに対するメナキノンの比率 (MK/Q) や、それぞれのキノン種の存在比に関しても、ほとんど変化が見られなかった。すなわち、投入した*A. calcoaceticus* は馴致した濃縮汚泥に定着し、濃縮汚泥も特別な影響を受けなかったことが考えられる。

図は示していないが、HRT=2日の場合、120h後から、キノン全体量が増加した。これに限って明るい場所で実験を行ったため、光合成を行う微生物の増殖が見られたことが、原因であると考えられる。そのため、同定はできなかったがPQと推測されるキノンが増加した。さらに、光合成によって放

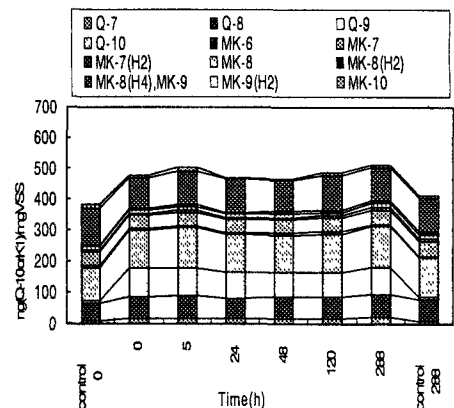


図3 キノプロファイル法による経時変化

出された酸素によって、*A. calcoaceticus* や他の好気性微生物の増殖が若干あったと考えられ、その他のキノン種も増加し、その存在比はほとんど変わらなかった。

3.3 COD及び発生ガス分析結果

図4には、溶存COD_{cr}の変化と、発生したメタンのCOD当量を示した。可溶化した溶存COD_{cr}は、比較実験（白抜き）と比べて、200-300mgCOD/l程度増加していた。

メタンガスの発生量は、HRTで比較すると10>5>2の順で多かったが、すべて微量であった。また、比較実験と比べると、20-50mgCOD/l程度増加していた。

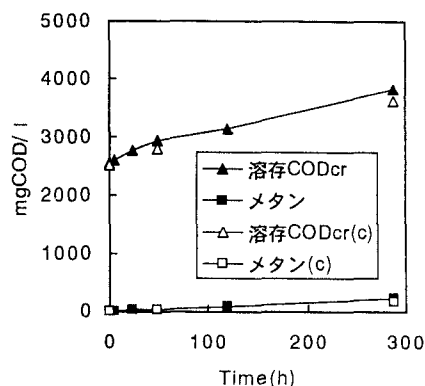


図4 COD当量の経時変化

3.4 まとめ

A. calcoaceticus の変化について、288時間後には、COD測定結果では、最初投入した*A. calcoaceticus* のCODの約10%分が比較実験に比べて余分に可溶化していた。これは、単純に*A. calcoaceticus* が約10%分解・可溶化したとも考えられるが、実際のところ、汚泥の中の何が変化したのか分からない。一方、キノンプロファイル法では、Q-9量が一定であったことから*A. calcoaceticus* 細胞の総量は変化しなかったと考えられ、またキノン種の存在比も変化なかったことから微生物相変化もなかった可能性が高いと考えられる。同様に、FISH法では、*A. calcoaceticus* の検出量が変化しないあるいは若干増加していた。すなわち、*A. calcoaceticus* を特異的に測定しているFISH法やキノンプロファイル法では、*A. calcoaceticus* の総量は減少せず、ほとんど変わらないか増加していると考えられる。以上のことから、本実験の嫌気的な濃縮汚泥では、好気的微生物*A. calcoaceticus* は12日間生存し続けることが分かった。キノンプロファイル法とFISH法との相関については、基本的には、同様な結果を示したことにより、相関性はあると言える。今後、FISH法による特定の機能に特異的なプローブが開発されれば、それらの微生物群の消長の観測ができたり、また、キノンプロファイルの数量解析により、嫌気槽への好気性余剰汚泥の流入時における微生物群の経時変化を定量的に追跡できるであろう。そのためには、より精度の高いFISH法の定量化手法の確立が必要である。

4. 結論

- 1) 濃縮汚泥中の、好気性微生物*A. calcoaceticus* は、FISH法、キノンプロファイル法及びCOD測定によって、その変化を観測することが可能であった。
- 2) 嫌気的な濃縮汚泥（HRTが2から10日の範囲で馴致）では、*A. calcoaceticus* は生存し続けることが分かった。

5. 参考文献

- 1) R.I. Amann, 1995 : Molecular Microbial Ecology Manual 3.3.6, pp.1-15, London: Kluwer Academic Publishers
- 2) 山田雄三、倉石 裕、1982 : 微生物の化学分類実験法（駒形和男編）、pp143-155、東京、学会出版センター
- 3) J. Bloem, 1995 : Molecular Microbial Ecology Manual 4.1.8, pp.1-12, London: Kluwer Academic Publishers
- 4) 山田健二ら、1997 : 第34回環境工学研究フォーラム講演集、pp88-90